



## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **62294693 A**

(43) Date of publication of application: 22 . 12 . 87

(51) Int. Cl

**C07H 21/00**

(21) Application number: 61139889

(71) Applicant: **SHIMADZU CORP**

(22) Date of filing: 16 . 06 . 86

(72) Inventor: **OOSUGI YOSHIAKI****(54) SIMULTANEOUS REACTION APPARATUS FOR PLURAL KINDS OF REACTANT**

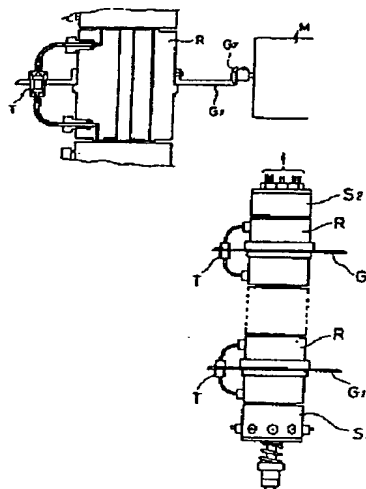
synthesize plural kinds of DNA or RAN.

COPYRIGHT: (C)1987,JPO&amp;Japio

**(57) Abstract:**

**PURPOSE:** The titled reaction apparatus, having a rotatable rotor capable of holding reactants and having a liquid passage to be a reaction chamber between two stators equipped with plural liquid inlets and liquid discharge outlets in the form of circumference and capable of simultaneously synthesizing plural different kinds of DNA, etc.

**CONSTITUTION:** A rotor (R) equipped with plural liquid passages capable of communicating between liquid inlets and liquid discharge outlets of each stator is provided between the first stator (S<sub>1</sub>) having plural liquid inlets in the form of a circumference and the second stator (S<sub>2</sub>) having plural liquid discharge outlets corresponding to the liquid inlets in a liquid tight state and plural layers and a rotating means (M) capable of independently rotating and sliding the rotor (R) with the circumferential shaft as a center. Any one of the liquid passages of each rotor (R) is capable of holding a reactant to constitute a reaction chamber (T). The resultant reaction apparatus is used to simultaneously



⑤ Int. Cl.<sup>4</sup>

C 07 H 21/00

識別記号

庁内整理番号

7138-4C

④ 公開 昭和62年(1987)12月22日

審査請求 未請求 発明の数 2 (全7頁)

⑥ 発明の名称 複数同時反応装置

⑦ 特 願 昭61-139889

⑧ 出 願 昭61(1986)6月16日

⑨ 発 明 者 大 杉 義 彰 京都市中京区西ノ京桑原町1番地 株式会社島津製作所三条工場内

⑩ 出 願 人 株式会社島津製作所 京都市中京区西ノ京桑原町1番地

⑪ 代 理 人 弁理士 野河 信太郎

## 明 細 書

## 1. 発明の名称

複数同時反応装置

## 2. 特許請求の範囲

1. 複数の液導入口を円周状に配設してなる第1ステータとこの液導入口に対応する複数の液排出口を円周状に配設してなる第2ステータとの間に、これら各ステータの液導入口-液排出口間を連通しうる複数の液流路を円周状に設けたロータが液密に複数積層配置されると共に、該ロータを上記円周軸を中心にそれぞれ独立して回転撹動しうる回転手段が付設されてなり、

上記各ロータの液流路のいずれか一つが各々被反応物を保持しうる反応室に構成されてなることを特徴とする複数同時反応装置。

2. 複数の液導入口を円周状に配設してなる第1ステータとこの液導入口に対応する複数の液排出口を円周状に配設してなる第2ステータとの間に、これら各ステータの液導入口-液排出口間を連通しうる複数の液流路を円周状に設けたロータ

が液密に複数積層配置されかつ各ロータの液流路のいずれか一つが各々被反応物を保持しうる反応室に構成された多層反応バルブと、上記各ロータを上記円周軸を中心にそれぞれ独立して回転撹動しうる回転手段と、前記各液流路にそれぞれ管路接続された複数の試薬・溶媒供給手段とから構成されてなり、

前記回転手段と上記各供給手段とに接続され、予め組み込まれた各液流路上への前記反応室編集プログラムに従ってこれら各液流路に試薬・溶媒の適当量A

$$A = B(1 + C(N - 1)) \quad (N \neq 0 \text{ のとき})$$

$$A = 0 \quad (N = 0 \text{ のとき})$$

ただし、N：流路上の反応室の数

B：反応室が1個のときの送液量

C：係数で  $0 \leq C \leq 1$

を送液しうるよう制御する制御手段を備えてなる複数同時反応装置。

## 3. 発明の詳細な説明

(イ) 産業上の利用分野

この発明は複数同時反応装置に関する。さらに詳しくは多段階反応により合成される化合物を複数合成する装置に関し、ことに複数の異種のDNAまたはRNA等(以下DNA等)を同時に合成するのに適した複数同時反応装置に関する。

#### (ロ) 従来の技術

従来、複数の異種のDNA等を合成する装置としては、各ヌクレオシドを固定した固形支持体を備えた複数の縮合反応部それぞれに、意図する複数の前処理剤およびヌクレオチド試薬溶液を所定の順で導入して縮合反応させ、これを繰返して合成する装置があり、このような装置においては上記縮合反応部それぞれが意図するDNA等合成試薬・溶媒等の液体(例えば、ヌクレオチド試薬溶液、マスキング剤試薬溶液、保護基脱離用試薬溶液、洗浄・乾燥用溶媒など)の液流路に対して並列に設置されているものが使用されていた。

#### (ハ) 発明が解決しようとする問題点

しかしながら、かかる従来の装置においては、縮合反応部にいたる各液流路が長く、またこれら

反応物を保持しうる反応室に構成されてなることを特徴とする複数同時反応装置が提供される。

この発明の複数同時反応装置は、複数の反応室が同一試薬を使用するときは反応室を直列にかつ液密に接続して試薬を一括に導入して同時に処理し、また別々の試薬を使用するときはそれぞれ対応する試薬供給流路上に各反応室を液密に配設して同時に処理しうるよう構成されたものであり、すなわち、それぞれ意図する試薬溶液・溶媒流路間に反応・処理毎に各反応室を介設して連結(以下編集という)する多層反応バルブに構成されている。

この発明の装置に設けられる反応室は、ロータの内部の流路内であってもロータの外部とくに側周に突出して設けられた流路内であってもよい。

これらの反応室は、通常、固相反応室が用いられ、例えば被反応物を固定した担体(樹脂粉末等)を液通過可能な多孔性膜等で保持して構成される。かかる反応室は上記被反応物の保持エリアを設定して構成されるがこの場合、ロータ外部に設けら

の液流路切換が複雑になり、コンタミネーションによる反応不全や試薬の無駄、装置の故障を招いていた。またかような装置では、同時に複数のDNA等を合成するのは困難でもある。

この発明はかかる状況に鑑み為されたものであり、ことに複数の反応部を所定の使用試薬毎に編集して連結することにより試薬および時間の無駄を減少しかつ流路を簡素化しうるよう構成された複数同時反応装置を提供しようとするものである。

#### (ニ) 問題点を解決するための手段

かくしてこの発明によれば、複数の液導入口を円周状に配設してなる第1ステータとこの液導入口に対応する複数の液排出口を円周状に配設してなる第2ステータとの間に、これら各ステータの液導入口-液排出口間を連通しうる複数の液流路を円周状に設けたロータが液密に複数積層配置されると共に、該ロータを上記円周軸を中心にそれぞれ独立して回転撻動しうる回転手段が付設されたり、

上記各ロータの液流路のいずれか一つが各々被

れる方が、担体等の脱着の簡便さの点から好ましい。

この発明の装置は、各ロータがそれぞれ独立して回転撻動して流路の切換、編集が行われる。

上記各平板状ロータは各々回転撻動可能にかつ液密に積層構成される。この際液密性を十分に保持するために、各ロータの各流路の開口部周縁にOリング状のバックリングを組み込んでおくことが好ましい。

この発明の装置に用いる回転手段としては、モータおよびギア等を用いたものが挙げられるが、この場合各ロータの外周が対応するギア状に形成されたものであってもよく、また各ロータに対応するギアが連結されたものであってもよい。

この発明の装置は前述のごとく多段階反应用の多層反応バルブとして用いられ、実際の使用に際してはステータに設けられた液導入口に各種の意図する溶液を供給しうる供給手段を接続した構成のものが用いられる。

上記供給手段は、意図する種類の反応試薬、洗

浄・乾燥用溶媒等を貯留した各貯留槽とこれらの各貯留槽と上記各液導入口とを接続する管路と各液体を輸送する送液手段とから構成されるものが好ましい。

上記のごとく構成される装置は、ことにDNA等を複数同時に合成する合成装置として通している。この場合用意される貯留槽としては例えば、複数のヌクレオチド試薬溶液、マスキング剤試薬溶液、保護基脱離用試薬溶液、洗浄・乾燥用溶媒等の各溶液に対応する貯留槽が挙げられ、このうち少なくとも各ヌクレオチド試薬溶液貯留槽は独立の管路で前記ステータの液導入口に接続される。

上記供給手段は、乾燥用のN：バージ管路が設定された構成であってもよい。

上記ヌクレオチド試薬溶液の供給は、供給すべき流路上に集まる反応室の数に応じて供給液量を自動的に調節して供給しうる構成とすることも可能である。すなわち、予め合成を意図するDNA等の配列に応じて反応室を各ヌクレオチド試薬溶液接続流路上に集める編集プログラムを組み、こ

ことになる。また、 $C \geq 1$ のときは時間のみが短縮される利点となる。従ってこの発明は、前記回転手段および各供給手段に接続されかつ上記式で規定される液量を送液しうるよう制御する制御手段を備えてなる複数同時反応装置をも提供するものである。

#### (ホ) 作用

この発明によれば、複数の反応に同一試薬等を用いる反応過程および別々の試薬等を用いる反応過程とからなる多段階反応、ことにDNA等の合成に対して、同一試薬等を用いる過程ではロータの回転撹動により複数の反応室を該試薬流路上に直列に連結して、送液するとこれらの反応室に一括して該試薬等が導入でき同時に反応を行うことができる。また別々の試薬等を使用する過程では、各対応する試薬等の流路上に各反応室をロータの回転により編集して直結し、各試薬等を送液すると各反応室には同時に意図する試薬等が供給され同時に反応が行える。また各反応に対する上記のごとき反応室の編集を予めプログラムしておきそ

のプログラムに沿って各液流路上に集まる反応室の数を認識し、その数に応じて適量のヌクレオチド試薬溶液を送液するように構成するもので、例えば前記多層反応バルブを駆動する駆動部と上記ヌクレオチド試薬溶液を送液する送液手段とに接続したCPUと、このCPUに接続し上記プログラムを入力しうる入力装置とを使用したものが挙げられる。

上記適量のヌクレオチド試薬溶液を送液する送液手段にはシリンジポンプの使用が好ましいが、通常の高圧送液の場合であっても送液時間や送液圧力の調整により適量に調節することもできる。

上記の適量とは、試薬送液量Aが

$$A = B(1 + C(N - 1)) \quad (N \neq 0 \text{ のとき})$$

$$A = 0 \quad (N = 0 \text{ のとき})$$

ただし、N：流路上の反応室の数

B：反応室が1個のときの送液量

C：係数で  $0 \leq C \leq 1$

で定義される量であり、このように設定された場合、従来に比べて試薬量および時間が節約できる

のプログラムに従って各液流路上に連結される反応室の数に応じて適量の試薬・溶媒等の送液を制御する制御手段を各送液手段に電気的に接続しておくことにより自動的に適量の試薬が供給され目的の反応物質群が同時に合成できる。

以下実施例によりこの発明を詳細に説明するが、これによりこの発明は限定されるものではない。

#### (ヘ) 実施例

第1図はこの発明の一実施例の複数同時反応装置を用いたDNA合成装置を例示する構成説明図である。

図において(1)は8種類のDNAを同時に合成することが可能に構成された複数同時反応装置、(2)は各種試薬溶液・溶媒供給装置、(3)はロータ駆動部である。

複数同時反応装置(1)は、上下1対の円板状(テフロン製)のステータ( $S_1$ )( $S_2$ )が固定され、その間に8枚の略同形の円板状(テフロン製)のロータ( $R_1$ )( $R_2$ )( $R_3$ )( $R_4$ )( $R_5$ )( $R_6$ )( $R_7$ )( $R_8$ )がそれぞれ独立に回転撹動可能に構成されている。

各ステータ( $S_1$ )( $S_2$ )および各ロータ( $R_1$ )( $R_2$ )( $R_3$ )( $R_4$ )( $R_5$ )( $R_6$ )( $R_7$ )( $R_8$ )それぞれには8個の連通路(4)が上下に連通しかつこの開口部が同一円周上に同間隔で設けられており、これらの流路の開口部周縁でかつ摺動面にあたる部分にはOリング(図示しない)がそれぞれはめられていて一方のステータ( $S_1$ )から他方のステータ( $S_2$ )まで連通する八本の液密な液流路を構成し、ステータ( $S_1$ )には液導入口が、ステータ( $S_2$ )には液排出口がそれぞれ開口して排出口からはさらに廃液タンク(5)へ管路が延設されている。

各ロータの8本の連通路のうち1つはそれぞれ反応室( $T_1$ )( $T_2$ )( $T_3$ )( $T_4$ )( $T_5$ )( $T_6$ )( $T_7$ )( $T_8$ )としてカラムに構成されている。この各反応室は第2図に示すように各ロータ外部の側周に設けられており、各反応室内部には意図するヌクレオシドを固定した各支持体樹脂の脱着が容易な構成にされている。

上記各支持体樹脂(6)は、第3図に示すように多孔質フィルタ(61)(61)間に保持されている。

接続されている。また、縮合試薬(C)槽からは上記各種ヌクレオチド試薬( $b_1$ )( $b_2$ )( $b_3$ )( $b_4$ )( $b_5$ )槽の各供給ポート(24)(25)(26)(27)(28)に管路(29)が接続されてこれら各種ヌクレオチド試薬と縮合試薬が混合して供給できるように管路構成されている。またさらに各貯留槽には第1図に示すごとく各三方電磁弁( $V_1$ )( $V_2$ )( $V_3$ )( $V_4$ )( $V_5$ )( $V_6$ )( $V_7$ )( $V_8$ )を有した分岐管路(30)がそれぞれ導入されており、この管路には窒素ガスポンプ(図示しない)からの窒素ガスが流入してこのガス圧により各溶液・溶媒が前記複数同時反応装置(1)の意図する液流路に送液されるように構成されている。

上記各種ヌクレオチド試薬の供給に関しては、ロータの回転摺動により各液流路上に編集される反応室の数に応じて常に通量を調節して供給する様に構成することも可能である。すなわち第4図に示すように、各種ヌクレオチド試薬供給ポート(24)(25)(26)(27)(28)にそれぞれY字状分岐管(7)を接続し、各Y字管の残る2本の管路にはそれぞれ三方電磁弁(71)(71)を介してそれぞれシリンジ

この各ロータが独立に回転摺動する構造は第2図に示すように、各ロータにおいて各突出した反応室の下部外周にギア状溝( $R_g$ )が形成され、これに対応するギア(G)を取り付けたモータ(M)がそれぞれのロータに対して独立にかつ互いに位置をずらして設置されて構成されている。またこれ以外の回転摺動しうる構造としては第2aおよび2b図に示すように、各ロータ(R)の胴体中央部でロータおよびロータ外部に設けられた反応室(T)を連結した各笠歯車( $G_1$ )とこれに対応する笠歯車( $G_2$ )を取り付けたモータ(M)とを組み合わせたものが挙げられる。

この複数同時反応装置(1)に接続されている各種試薬溶液・溶媒供給装置(2)は、保護基脱離用試薬( $a_1$ )、洗浄溶媒( $a_2$ )、マスキング用試薬( $a_3$ )、各種ヌクレオチド試薬( $b_1$ )( $b_2$ )( $b_3$ )( $b_4$ )( $b_5$ )、縮合試薬(C)をそれぞれ貯留した各貯留槽を有しており、縮合試薬(C)槽以外の各貯留槽からは上記ステータ( $S_2$ )の各液導入口へそれぞれ独立に供給ポート(21)(22)(23)(24)(25)(26)(27)(28)が管路

ポンプ(72)(72)を接続しかつ各三方電磁弁の残る管路それぞれにはヌクレオチド試薬(a)貯留槽および縮合試薬(C)貯留槽を管路接続し、上記各シリンジポンプを駆動するシリンジポンプ駆動部(8)を入力装置(10)を備えたCPU(9)に接続しかつこのCPU(9)に前記複数同時反応装置(1)のロータ駆動部(3)を接続した構成のものが挙げられる。この場合、合成するDNA配列を入力装置(10)からCPU(9)に指示し、CPU(9)は指示された配列に従いロータ駆動部(3)を駆動して反応室を編集すると同時に各液流路上に編集された反応室の数に基づいてシリンジポンプ駆動部(8)を駆動する。このとき各シリンジポンプで送液されるヌクレオチド試薬量または縮合試薬量 A は、

$$A = B(1 + C(N - 1)) \quad (N \neq 0 \text{ のとき})$$

$$A = 0 \quad (N = 0 \text{ のとき})$$

ただし、N:流路上の反応室の数

B:反応室が1個のときの送液量

C:係数で  $0 \leq C \leq 1$

となるように調節される。また、このように調節された量は各シリジポンプの駆動距離または駆動回転の調整により送液される。

次にこのDNA合成装置によりGTT, IGG, CIA, TAC, TGT, TCT, ATA, GACの8種類のDNAをホスホトリエステル法で合成する場合を第1図の構成説明図に基づいて説明する。

保護基脱離用試薬(a<sub>1</sub>)としてトリクロロ酢酸と塩化メチレンの混合溶液を、洗浄溶媒(a<sub>2</sub>)として塩化メチレンを、マスキング用試薬(a<sub>3</sub>)として無水酢酸とビリジンの混合溶液をそれぞれの各貯留槽に用意し、ヌクレオチド試薬としては左から順にアデニン(A)、シトシン(C)、グアニン(G)、チミン(T)の各塩基からなる各ヌクレオチドのビリジン溶液(b<sub>1</sub>)(b<sub>2</sub>)(b<sub>3</sub>)(b<sub>4</sub>)およびオブションとしてイノシン酸(I)のビリジン溶液(b<sub>5</sub>)がそれぞれ調製されて各貯留槽に用意してある。

また上各ロータの反応室(T<sub>1</sub>)(T<sub>2</sub>)(T<sub>3</sub>)(T<sub>4</sub>)(T<sub>5</sub>)(T<sub>6</sub>)(T<sub>7</sub>)(T<sub>8</sub>)には、(T<sub>1</sub>)から順にそれぞれ塩基T

次いで上記三方電磁弁(V<sub>1</sub>)(V<sub>2</sub>)(V<sub>3</sub>)(V<sub>4</sub>)(V<sub>5</sub>)(V<sub>6</sub>)をそれぞれ点線側に切換えた後、また再び全反応室(T<sub>1</sub>)~(T<sub>8</sub>)をロータ駆動部(3)により供給ポート(22)上に直列に編集し上記と同様にして洗浄する。

洗浄後三方電磁弁(V<sub>7</sub>)を点線側に切換えロータ駆動部(3)により全反応室(T<sub>1</sub>)~(T<sub>8</sub>)を供給ポート(23)上に直列に編集して三方電磁弁(V<sub>8</sub>)のみを実線側に切換えて窒素圧によりマスキング試薬を全反応室に導入する。これにより結合したDNA分子の末端部分の反応基が保護基でブロックされる。この後三方電磁弁(V<sub>9</sub>)を点線側に切換える。

次いで上記と同様にロータ駆動部(3)により供給ポート(24)(25)(26)(27)(28)上に各反応室(T<sub>1</sub>)~(T<sub>8</sub>)を第6図のごとく編集し、かつ三方電磁弁(V<sub>1</sub>)(V<sub>2</sub>)(V<sub>3</sub>)(V<sub>4</sub>)(V<sub>5</sub>)(V<sub>6</sub>)を実線側に切換えると同時に窒素圧により各ヌクレオチド試薬およびイノシン酸試薬を所定量の縮合試薬とともに混合して各反応室に導入する。

次いで上記三方電磁弁(V<sub>1</sub>)(V<sub>2</sub>)(V<sub>3</sub>)(V<sub>4</sub>)(V<sub>5</sub>)(V<sub>6</sub>)

G, A, C, T, T, A, Cを有するヌクレオチドを固定した支持体樹脂が挿入されている。

このように設定されたDNA合成装置においてロータ駆動部(3)によりまず供給ポート(21)上に全反応室(T<sub>1</sub>)~(T<sub>8</sub>)を直列に編集し三方電磁弁(V<sub>1</sub>)のみを実線側に切換えて窒素圧により保護基脱離用試薬を各反応室に導入する。

この後三方電磁弁(V<sub>1</sub>)を点線側に切換え、ロータ駆動部(3)により上記全反応室(T<sub>1</sub>)~(T<sub>8</sub>)を供給ポート(22)上に直列に編集して三方電磁弁(V<sub>2</sub>)のみを実線側に切換えて窒素圧により洗浄溶媒を各反応室に導入した後三方電磁弁(V<sub>2</sub>)を点線側に切換える。

次にロータ駆動部(3)により供給ポート(24)(25)(26)(27)(28)上に各反応室(T<sub>1</sub>)~(T<sub>8</sub>)を第5図のごとく編集し、かつ三方電磁弁(V<sub>3</sub>)(V<sub>4</sub>)(V<sub>5</sub>)(V<sub>6</sub>)(V<sub>7</sub>)(V<sub>8</sub>)を実線側に切換えると同時に窒素圧により各ヌクレオチド試薬およびイノシン酸試薬を所定量の縮合試薬とともに混合して各反応室に導入する。

a<sub>3</sub>)をそれぞれ点線側に切換えた後、また再び全反応室(T<sub>1</sub>)~(T<sub>8</sub>)をロータ駆動部(3)により供給ポート(22)上に直列に編集し上記と同様にして洗浄する。

上記操作により各反応室には各支持体の樹脂にそれぞれ意図したトリエステル体のDNA、すなわちGTT, IGG, CIA, TAC, TGT, TCT, ATA, GACの8種類が生成される。

#### (ト) 発明の効果

この発明によれば、同一の試薬を使用する複数の反応を一つの流路上で同時に行うことができ試薬の節約および時間の短縮が図れる。また、各試薬毎、各溶媒毎に反応室を編集することができるので試薬、溶媒等を効率良く使用できる。さらに流路が簡素化されて小型化できる。またさらにDNA等の合成においては配列の異なる多種類のDNA等を同時にかつ簡便に合成することができる。また、この発明の装置の駆動部と溶液供給手段の送液手段とをCPUに接続して用いることにより流路上の反応室の数にかかわらず常に適当な液

量を反応室に供給することができる。

#### 4. 図面の簡単な説明

第1図はこの発明の一実施例の複数同時反応装置を用いたDNA合成装置を例示する構成説明図、第2図は反応室およびロータの回転摺動手段の構成を説明する部分構成説明図、第2aおよび2b図は第2図の他の実施例を説明する構成説明図および部分構成説明図、第3図は反応室の断面図、第4図は試薬を反応室の数に応じて自動的に適量に調節して供給する供給装置の構成説明図、第5図および第6図はそれぞれ複数の異なるDNAを同時合成する過程を説明する部分構成説明図である。

- (1) …… 複数同時反応装置、
- (2) …… 試薬・溶媒供給装置、
- (3) …… ロータ駆動部、      (4) …… 連通路、
- (8) …… シリンジポンプ駆動部、(9) …… CPU、
- (10) …… 入力装置、
- (21)～(28) …… 供給ポート、
- (S<sub>1</sub>)(S<sub>2</sub>) …… ステータ、(R<sub>1</sub>)～(R<sub>8</sub>) …… ロータ、
- (T<sub>1</sub>)～(T<sub>8</sub>) …… 反応室、

(V<sub>1</sub>)～(V<sub>8</sub>) …… 三方電磁弁、

(a<sub>1</sub>) …… 保護基脱離用試薬、(a<sub>2</sub>) …… 洗浄溶媒、

(a<sub>3</sub>) …… マスキング用試薬、

(b<sub>1</sub>)～(b<sub>8</sub>) …… ヌクレオチド試薬、

(C) …… 縮合試薬、

(R<sub>g</sub>) …… ギア状溝、

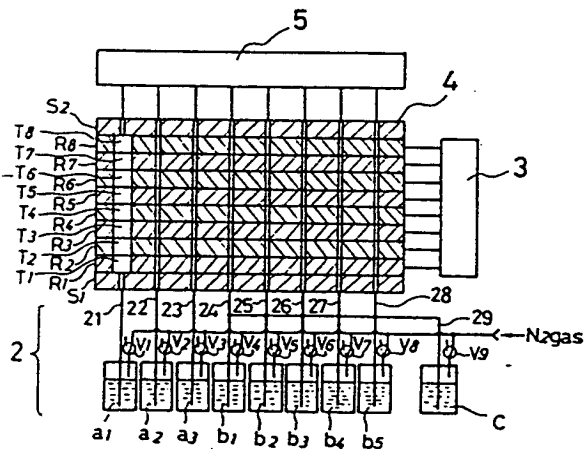
(G) …… ギア、

(M) …… モータ

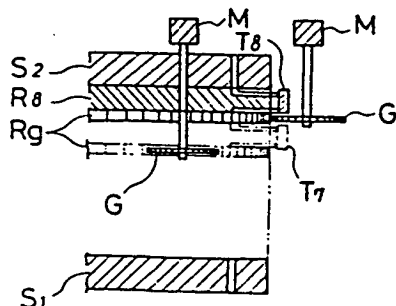
代理人 弁理士 野河 信太



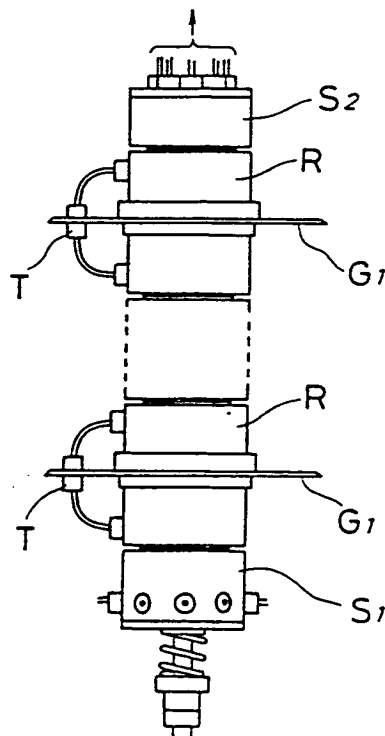
第1図

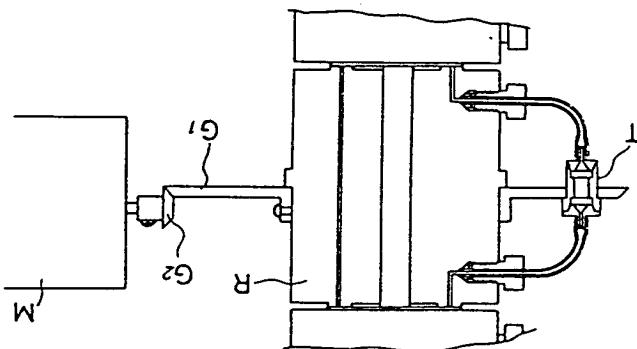


第2図

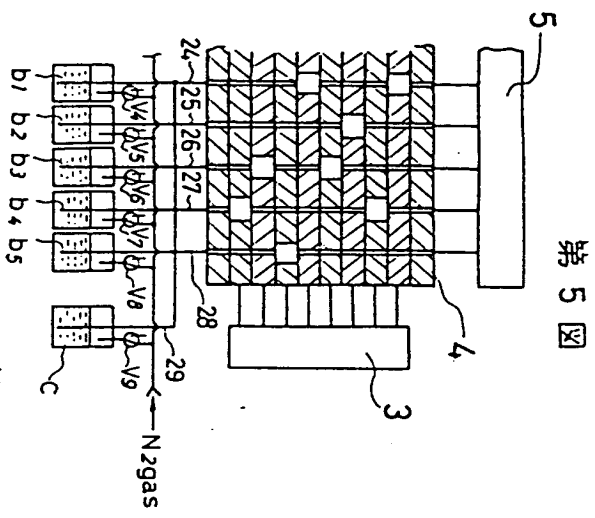


第2a図

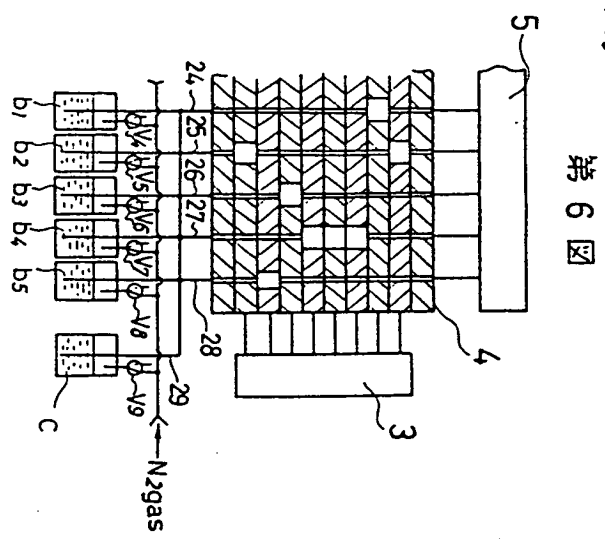




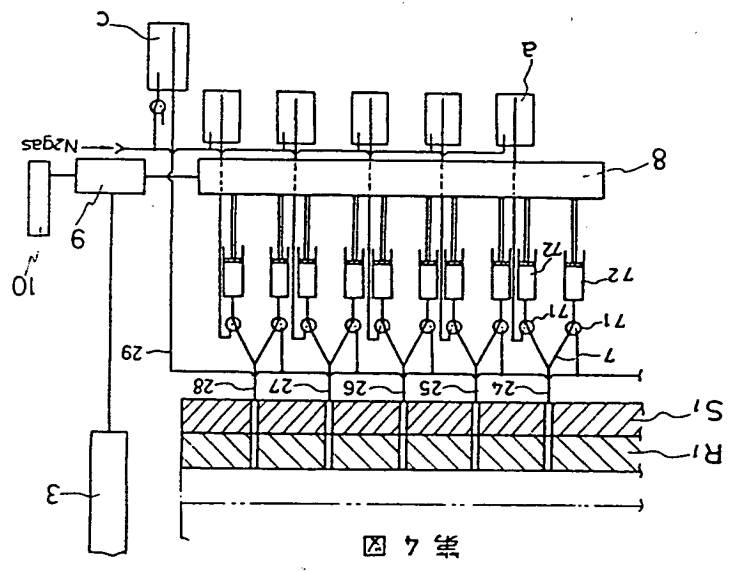
第 2b 図



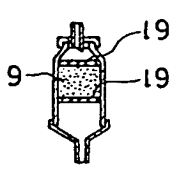
第 5 図



第 6 図



第 4 図



第 3 図